



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 114 502**

⑫ Número de solicitud: **9601685**

⑤① Int. Cl.⁶: **A61K 9/51**

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫② Fecha de presentación: **29.07.96**

⑫③ Fecha de publicación de la solicitud: **16.05.98**

⑫④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.05.98

⑦① Solicitante/s:

**Universidade de Santiago de Compostela
y en su Nombre y Representación el Rector
Centro de Transferencia de Tecnoloxía
Avda. das Ciencias s/n
15706 Santiago de Compostela, Coruña, ES**

⑦② Inventor/es: **Alonso Fernández, María José;
Calvo Salve, Pilar;
Remuñán López, Carmen y
Vila Jato, José Luis**

⑦④ Agente: **No consta**

⑤④ Título: **Aplicación de nanopartículas a base de polímeros hidrofílicos como formas farmacéuticas.**

⑤⑦ Resumen:

Aplicación de nanopartículas a base de polímeros hidrofílicos como formas farmacéuticas para la administración de macromoléculas activas. Las nanopartículas (de tamaño nanométrico y carácter hidrofílico), también denominadas nanosferas o latexes, son sistemas coloidales formados por la combinación de polímeros hidrofílicos y un ingrediente activo de elevado peso molecular (macromolécula activa, peso molecular superior a 1000 daltons). Los polímeros hidrofílicos son el quitosano (un aminopolisacárido) o sus derivados y el polioxietileno o sus derivados. La asociación de la macromolécula activa a dichas nanopartículas transcurre en fase acuosa sin necesidad de utilizar disolventes orgánicos ni sustancias auxiliares de naturaleza tóxica. La capacidad de carga de ingrediente activo de las nanopartículas es extremadamente elevada y además dicha carga es liberada de un modo controlado y prolongado en el tiempo. Además dichas nanopartículas presentan una carga eléctrica superficial positiva cuya intensidad puede variarse en base a su composición.

ES 2 114 502 A1

DESCRIPCION

Aplicación de nanopartículas a base de polímeros hidrofílicos como formas farmacéuticas para la administración de macromoléculas activas.

Los componentes principales de estas partículas son dos polímeros hidrofílicos, uno el quitosano (dotado de carga positiva) y otro el polioxietileno (de carácter no iónico y propiedades tensoactivas) además del ingrediente activo que puede ser una macromolécula terapéutica o anti-génica (péptido, proteína, antígeno, oligonucleótido, ARN, ADN...). La carga eléctrica de las nanopartículas coloidales puede oscilar desde un valor positivo hasta un valor próximo a la neutralidad, dependiendo de la proporción relativa de ambos polímeros. El tamaño de las partículas puede oscilar desde unos pocos nanómetros hasta varias micras.

El quitosano (polímero de origen natural) que presenta estructura aminopolisacáridica y carácter catiónico, se obtiene mediante un proceso de deacetilación de la quitina (molécula que se extrae del caparazón de los crustáceos). El quitosano se comercializa con diferentes pesos moleculares y distinto grado de deacetilación bajo la forma de base o sal (clorhidrato o glutamato de quitosano).

El polioxietileno (PEO) es un polímero sintético de carácter no iónico. El polioxietileno y los copolímeros bloque del óxido de etileno-óxido de propileno (PEO-PPO) (poloxameros) se comercializan con distintos pesos moleculares y diferente proporción de grupos etileno y propileno. Su utilización en la preparación de sistemas coloidales inyectables, principalmente la variedad que contiene un 80 % de óxido de etileno, es frecuente debido a su ausencia de toxicidad.

El rendimiento de asociación de las macromoléculas activas a dichas partículas es dependiente de la composición del sistema (relación de ambos polímeros) y de las propiedades fisicoquímicas de la molécula que se pretende asociar.

La incorporación de las macromoléculas activas a las nanopartículas se consigue mediante un procedimiento extremadamente sencillo y suave, especialmente adecuado para preservar la delicadeza estructural de las macromoléculas. La incorporación se produce en virtud de una interacción entre el quitosano y la macromolécula que se pretende asociar. La formación de las nanopartículas tiene lugar debido a un proceso de precipitación conjunta del quitosano y de la macromolécula activa en forma de nanoagregados poliméricos, causado por la adición de un agente de carácter básico como es el tripolifosfato. No se requiere la utilización de disolventes orgánicos ni condiciones extremas de pH ni sustancias auxiliares de naturaleza tóxica.

La asociación de las macromoléculas activas a las nanopartículas se produce según un mecanismo combinado de interacción iónica y no iónica, además de un atrapamiento físico. La interacción iónica entre el quitosano y otros polímeros de carga opuesta ha sido el mecanismo predominante para la elaboración de microcápsulas por coacervación compleja (T. Takahashi, K. Takayama, Y. Machida and N. Nagai, Chitosan-Alginate complex coacervate capsules: Effects of cal-

cium chloride, Plasticizers, and polyelectrolites on mechanical stability, *Biotechnology Progress*, 4, 76-81 (1988) y para la formación de complejos (M. M. Daly and D. Kloor, Characteristics of polyion complexes of chitosan with sodium alginate and sodium polyacrylate, *Int. J. Pharm.* 61, 35-41 (1990)). Sin embargo, la asociación de macromoléculas activas a nanopartículas de quitosano o de quitosano-PEO en virtud de un mecanismo de interacción iónica no ha sido descrita hasta el momento. Además, la incorporación de la macromolécula activa a las nanopartículas se produce tras la incorporación al medio de un agente inductor de la reticulación y precipitación del quitosano.

Es de destacar el interés actual de las nanopartículas hidrofílicas, como lo demuestra la abundante literatura existente en este campo. Ciertamente, se han publicado numerosos trabajos que describen diversos métodos de elaboración de nanopartículas a base de macromoléculas de origen natural (W. Lin, A. G. A. Coombes, M. C. Garnett, M. C. Davies, E. Stacht, S. S. Davis and L. Illum, Preparation of sterically stabilized human serum albumin nanospheres using a novel dextranox-MPEG crosslinking agent, *Pharm. Res.*, 11, (1994)), (H. J. Watzke and C. Dieschbourg, Novel silica-biopolymer nanocomposites: the silica sol-gel process in biopolymer organogels, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 50, 1-14 (1994)), (M. Rajaonarivony, C. Vauthier, G. Couarrage, F. Puisieux and P. Couvreur, Development of a new drug carrier made from alginate, *J. Pharm. Sci.*, 82, 912-917 (1993)). Sin embargo, no se ha descrito la aplicación de estas partículas para la asociación y liberación controlada de ingredientes activos de elevado peso molecular como son los péptidos, proteínas, antígenos, oligonucleótidos,... Ello podría deberse a que la mayoría de esos métodos requieren el uso de disolventes orgánicos, aceites, elevadas temperaturas y agentes reticulantes, circunstancias que conllevan en general la destrucción de este tipo de macromoléculas. Por otro lado, recientemente se ha propuesto la aplicación de las nanopartículas hidrofílicas de naturaleza sintética, elaboradas a base de copolímeros del ácido láctico y del PEO, para la asociación y liberación controlada de péptidos y proteínas (Quellic, P., Gref, R., Calvo, P., Alonso, M. J. and Dellacherie, E., Encapsulation of a model protein and a hydrophobic drug into long-circulating biodegradable nanospheres, *Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*, 23 (1996), CRS. Inc.). Sin embargo, la limitación más importante de estas nanopartículas se centra, una vez más, en la necesidad de utilizar disolventes orgánicos de naturaleza tóxica para su preparación.

A pesar del esfuerzo por parte de numerosos investigadores dedicado a la formulación de macromoléculas activas, en la biografía y revisión de patentes no se ha encontrado referencia alguna a la aplicación de las nanopartículas de quitosano, o bien, quitosano-PEO o quitosano-PEO-PPO para la asociación y liberación controlada de macromoléculas de interés terapéutico antigénico.

Con la presente invención se resuelven los problemas planteados en los desarrollos procedentes

consiguiendo la formación de una nueva composición farmacéutica basada en asociación de macromoléculas activas a nanopartículas de extremo carácter hidrofílico. Los componentes mayoritarios de las nanopartículas portadoras de las macromoléculas son dos polímeros hidrofílicos, en particular el quitosano o uno de sus derivados y el PEO o uno de sus derivados. La presencia del polioxietileno no es necesaria para la obtención de las partículas, pero permite modificar las características fisicoquímicas de las mismas (tamaño de partícula y potencial zeta), modular la liberación de la macromolécula incorporada y mejorar la biocompatibilidad de las nanopartículas de quitosano. La proporción de ambos polímeros puede ser muy variable, pudiendo ser la proporción de uno de ellos 50 veces superior a la del otro. La proporción en la que se asocia el ingrediente activo (péptido o proteína) puede alcanzar valores del 100 % (rendimiento de asociación).

Los sistemas coloidales o nanopartículas propuestos para la asociación y liberación controlada de macromoléculas activas presentan numerosas ventajas sobre otros previamente descritos en trabajos publicados no únicamente desde un punto de vista preparativo, sino también desde la óptica de su interés como nuevas formas farmacéuticas administrables por todas las vías de administración actualmente concebidas. Las ventajas más relevantes de estas nuevas formulaciones incluyen: (1) el procedimiento de incorporación de la macromolécula activa a las mismas es sencillo y no requiere la utilización de ingredientes tóxicos para el organismo, tales como disolventes orgánicos y aceites, (2) sus propiedades fisicoquímicas, en concreto su tamaño, hidrofilia y carga superficial, son modulables en función de la relación de quitosano-PEO, (3) presentan una extraordinaria capacidad de asociación de macromoléculas terapéuticas y antigéncias, y (4) liberan la macromolécula activa que llevan incorporada a una velocidad controlada.

Dentro de las vías para las que estos sistemas ofrecen interés destacan, por un lado, aquellas que conllevan el contacto del sistema con una superficie epitelial tales como la vía oral, transdérmica, ocular, nasal y vaginal, y por otro lado, aquellas que llevan asociada una inyección. En el primer caso, el contacto de estas partículas coloidales con el epitelio podrá verse favorecido dotando a las partículas de una importante carga positiva, lo que favorecerá su interacción con las citadas superficies mucosas cargadas negativamente. En el segundo caso, más en concreto para la administración intravenosa, estos sistemas ofrecen la posibilidad de modular la distribución in vivo de los fármacos o moléculas activas que llevan asociadas.

Así pues, en la invención proveemos nuevas composiciones de interés farmacéutico para la administración de macromoléculas activas. Estos sistemas, constituidos por una suspensión de nanopartículas, pueden presentarse bajo una forma líquida de viscosidad variable. Las nanopartículas están constituidas a base de los polímeros poloxamer y quitosano (éste en forma base o sal) y pueden contener una cantidad variable de una macromolécula activa de carácter terapéutico o antigénico. Aunque es posible la incorporación de

macromoléculas activas a nanopartículas formadas únicamente a base de quitosano, la inclusión del polímero poloxamer en el sistema permite modular las características de las nanopartículas en términos de tamaño de partícula, potencial Z e hidrofilia, (como se puede observar en la Tabla 1).

El aspecto más destacable de la presente invención es el que se refiere a la aplicación de las nanopartículas de quitosano como formas de administración de ingredientes activos de elevado peso molecular y de carácter hidrofílico. Este aspecto es de extraordinario interés si tenemos en cuenta que la mayor parte de los sistemas nanoparticulares patentados en la actualidad permiten únicamente la encapsulación de medicamentos y otros ingredientes de carácter lipofílico.

Como ingrediente activo se entiende aquél para el que se diseña la formulación, es decir aquél que ha de desempeñar una determinada función tras su administración a un organismo vivo. La función puede ser la de combatir, paliar o prevenir una enfermedad (vacunas, vitaminas...), mejorar el aspecto físico y estético (hidratación de la piel, prevención o facilitación de la caída del cabello) y similares.

Los sistemas farmacéuticos que describimos se caracterizan por presentar un tamaño de partícula inferior a 1 μm , por lo que se denominan nanopartículas, y por presentar una elevada capacidad de asociación de macromoléculas. Se ha observado que el tamaño de las partículas es altamente dependiente de la concentración de quitosano en el medio acuoso en el que se desarrollan las nanopartículas, de hecho para concentraciones demasiado bajas (inferiores a 0,01 % en fase acuosa) o demasiado elevadas (superiores a 0,5 % en fase acuosa) se obtiene únicamente una solución o grandes partículas de elevado tamaño (superior a 1 μm), respectivamente. Además el tamaño de las nanopartículas se encuentra altamente influenciado por la contracción de poloxamer, con el que interacciona el quitosano. Por ejemplo, según se refleja en la Tabla 1, al aumentar la relación quitosano/poloxamer desde un 1/0 hasta un 1/50 se produce un incremento apreciable del tamaño de partícula (desde 275 nm hasta 685 nm) y una reducción en el valor de potencial Z.

Utilizando la albúmina como macromolécula terapéutica modelo, se ha puesto de manifiesto un elevado rendimiento de asociación de dicha molécula a las nanopartículas de poloxamer-quitosano, observándose que dicho rendimiento es dependiente de la concentración de la albúmina y de la presencia de poloxamer en el medio acuoso en el que se desarrollan las nanopartículas (Tabla 2). La tabla 2 muestra además que la inclusión de la albúmina en las citadas nanopartículas no conduce a modificaciones importantes ni en el tamaño de partícula ni en el potencial Z. Por otro lado, se ha observado que el momento en que se incorpora la albúmina a las nanopartículas tiene un efecto notable en el rendimiento de asociación, observándose el máximo rendimiento cuando la proteína se incorpora a la solución del agente reticulante tripolifosfato (TPP) y el mínimo rendimiento cuando la albúmina se incorpora a las nanopartículas previamente formadas (Tabla 3). Asimismo, es destacable el hecho de que el pH

del medio en el que se produce la asociación de la proteína a las nanopartículas juega un papel primordial en el rendimiento de asociación de la albúmina a las nanopartículas (Tabla 4).

Un aspecto importante de la aplicación de las nanopartículas de quitosano como sistemas farmacéuticos es su capacidad para liberar la macromolécula activa que llevan asociada durante periodos de tiempo prolongados. Además, dichas nanopartículas liberan la macromolécula asociada a una velocidad que puede ser modulada en base a la presencia de poloxamer y a la cantidad de macromolécula activa que llevan asociada.

La figura 1 representa la liberación de la albúmina a partir de nanopartículas de quitosano con diferentes concentraciones de poloxamer: (■) quitosano/poloxamer 1/0; (○) quitosano/poloxamer 1/5; (▲) quitosano/poloxamer 1/25. Representado en abscisas el tiempo (días) y en ordenadas la cantidad de albúmina liberada expresada en porcentaje (%).

La figura 2 muestra la liberación de la misma de la albúmina a partir de nanopartículas de quitosano con diferente carga de albúmina: (Δ) 41 % albúmina/quitosano; (●) 25 % albúmina/quitosano; (□) 20 % albúmina/quitosano. Representando en abscisas el tiempo (días) y en ordenadas la cantidad de albúmina liberada expresada en porcentaje (%).

Por otro lado, la aplicación de las nanopartículas de quitosano como sistemas portadores de macromoléculas antigénicas se ha puesto de manifiesto utilizando el toxoide tetánico y diftérico como ejemplos. La tabla 5 muestra el rendimiento de asociación de ambos antígenos a las nanopartículas. Además, los estudios de liberación in vitro de la vacuna antitetánica han revelado la liberación de la vacuna a partir de las nanopartículas en su forma activa.

En resumen, la presente invención recoge una nueva composición farmacéutica que puede ser utilizada para la administración de macromoléculas activas por diferentes vías, incluyendo tópica, oral, nasal, pulmonar, vaginal, ocular, subcutánea, intramuscular e intravenosa.

Aparecerán otras finalidades, características y ventajas de la invención a la luz de la descripción explicativa que sigue en la que se muestran ejemplos, simplemente a título ilustrativo y que en modo alguno pretenden limitar el alcance de la invención.

Ejemplo 1

Asociación de la albúmina (proteína modelo) a las nanopartículas de quitosano.

Se preparó una suspensión de nanopartículas de la siguiente composición (% p/p):

Quitosano	0,14 %
Tripolifosfato	0,02 %
Albúmina (BSA)	0,014 %
Agua	hasta 100 %

La preparación se llevó a cabo del modo siguiente:

Se prepararon 25 mL de una solución acuosa ácida (ácido acético 0,05 M) de quitosano al 0,2 % (p/v) ajustándola a pH 5. A continuación se incorporó 5 mg de albúmina (BSA, bovino serum albumin) y a continuación 10 mL de la solución

de tripolifosfato (0,1 %) bajo agitación magnética a 100 rpm. La suspensión se mantuvo bajo agitación continua durante 30 minutos.

Una vez obtenida las nanopartículas se determinó su tamaño de partícula, potencial Z y rendimiento de asociación de la albúmina expresado en cantidad de albúmina asociada a las nanopartículas por cantidad empleada en la elaboración de las mismas. Los valores obtenidos para los citados parámetros son 402 nm, 46 mV y 100 % respectivamente.

Ejemplo 2

Asociación de la albúmina a las nanopartículas de quitosano/PEO-PPO en proporción 1/5 (p/p).

Se preparó una formulación similar a la descrita en el ejemplo 1 pero conteniendo PEO-PPO. El procedimiento fue similar al descrito anteriormente habiendo incorporado el PEO-PPO a la solución de quitosano a pH = 4 previamente a la incorporación de la albúmina.

Quitosano	0,14 %
PEO-PPO	0,70 %
Albúmina	0,014 %
Tripolifosfato	0,02 %
Agua	hasta 100 %

Los resultados de tamaño de partícula, potencial Z y rendimiento de asociación de la albúmina fueron 519 nm, 43,6 mV y 78,2 %.

Ejemplo 3

Asociación de la albúmina a las nanopartículas de quitosano/PEO-PPO en proporción 1/25 (p/p).

Se preparó una formulación similar a la descrita en el ejemplo 2 pero conteniendo una cantidad 5 veces superior de PEO-PPO. El procedimiento fue idéntico al descrito anteriormente.

Quitosano	0,014 %
PEO-PPO	3,50 %
Albúmina	0,014 %
Tripolifosfato	0,02 %
Agua	hasta 100 %

Los resultados de tamaño de partícula, potencial Z y rendimiento de asociación de la albúmina fueron 7,41 nm, 33,9 mV, 45,9 % respectivamente.

Ejemplo 4

Asociación del toxoide tetánico a nanopartículas de quitosano:

Se preparó una formulación similar a la descrita en el ejemplo 1 pero conteniendo el toxoide tetánico en la proporción señalada. El procedimiento fue idéntico al descrito anteriormente.

Quitosano	0,14 %
Toxoide	0,014 %
Tripolifosfato	0,02 %
Agua	hasta 100 %

Los resultados de tamaño de partícula, potencial Z y rendimiento de asociación del toxoide fueron 245 nm, 35 mV y 53 % respectivamente.

Ejemplo 5

Asociación del toxoide diftérico a nanopartículas de quitosano:

Se preparó una formulación similar a la descrita en el ejemplo 1 pero conteniendo el toxoide diftérico en la proporción señalada. El procedimiento fue idéntico al descrito anteriormente.

Quitosano	0,14 %
Toxoide diftérico	0,007 %
Tripolifosfato	0,02 %
Agua	hasta 100 %

Los resultados de tamaño de partícula, potencial Z y rendimiento de asociación fueron 245 nm y 35,7 mV y 55 % respectivamente.

TABLA 1

Valores de tamaño de partícula y potencial Z obtenidos para relaciones de quitosano/PEO-PPO intermedios

Quitosano/PEO-PPO (p/p)	Tamaño (nm)*	Potencial Z (mV)#
1/0	275	43,96
1/2,5	283	41,24
1/5	300	40,54
1/25	430	27,99
1/50	685	17,89

* Determinado por espectroscopía de correlación fotónica

Determinado por dispersión de rayos láser

TABLA 2

Rendimiento de asociación de la albúmina a las nanopartículas con la composición descrita anteriormente

Quitosano/Albúmina (p/p)	Tamaño (nm)*	Potencial Z (mV)#	% Asociado
10/1	402±24	45±1	80
4/1	359±35	45±1	43
2/1	375±26	45±1	26
1/1	368±72	46±2	21

* Determinado por espectroscopía de correlación fotónica

Determinado por dispersión de rayos láser

TABLA 3

Rendimiento de asociación de la albúmina (BSA) a las nanopartículas de quitosano, en función del momento en el que se incorpora la albúmina

Quitosano/BSA (p/p)	% BSA asociada		
	Nanopartículas	BSA + quitosano	BSA + TPP
10/1		80,4	100
2/1	10.8	26,8	45,2
1/1		21,6	41,8

TABLA 4

Rendimiento de asociación de la albúmina a las nanopartículas de quitosano, en función del pH de la solución de quitosano

Quitosano/Albúmina (p/p)	% Asociado		
	pH 3	pH 4	pH 5
10/1	66,8	80,4	91,7
2/1	25,7	26,8	39,1
1/1	19,4	21,6	35,5

Los resultados de rendimiento de asociación del toxoide tetánico y del toxoide diftérico a las nanopartículas de quitosano se reflejan en la tabla 5. En la tabla se muestra la influencia del pH de la solución de quitosano y de la concentración de toxoide tetánico en el grado de asociación del mismo a las nanopartículas de quitosano.

TABLA 5

Toxoide	Quitosano/toxoide (p/p)	pH	% Asociado
Tetánico	1/0,06	4	4,27
Tetánico	1/0,06	4	15,9
Tetánico	1/0,12	5	53,3
Diftérico	1/0,12	5	55,1

REIVINDICACIONES

1. Aplicación de nanopartículas a base de polímeros hidrofílicos como formas farmacéuticas para la administración de macromoléculas activas **caracterizadas** porque los componentes principales son: un aminopolisacárido, un derivado polioxietilenado y un ingrediente activo de elevado peso molecular.

2. Composiciones farmacéuticas, según la reivindicación 1, **caracterizadas** porque las nanopartículas tienen un tamaño inferior a 1 mm, carga eléctrica (potencial Z) positiva y capacidad para incorporar ingredientes activos y proteínas.

3. Composiciones farmacéuticas, según la reivindicación 1, **caracterizadas** porque el aminopolisacárido se elige del grupo de la quitina y los quitosano o cualquiera de sus derivados.

4. Composiciones farmacéuticas, según la reivindicación 1, **caracterizadas** porque el derivado polioxietilenado es del grupo compuesto del polioxietileno y los copolímeros del óxido de etileno y óxido de propileno.

5. Composiciones farmacéuticas, según la reivindicación 1, **caracterizadas** porque el ingrediente activo que contiene se elige del grupo de las macromoléculas del tipo peptídico, poteico, poli-

sacárido, nucleótido, con actividad terapéutica o antigénica.

6. Composiciones farmacéuticas, según la reivindicación 5, **caracterizadas** porque el ingrediente activo que contiene es el toxoide tetánico.

7. Composiciones farmacéuticas, según la reivindicación 5, **caracterizadas** porque el ingrediente activo que contiene es el toxoide diftérico.

8. Composiciones farmacéuticas, según la reivindicación 4, **caracterizadas** porque el porcentaje de polioxietileno con respecto al peso total de los ingredientes comprende desde el 0 % hasta el 60 % en peso.

9. Composiciones farmacéuticas, según la reivindicación 5, **caracterizadas** porque la cantidad de ingrediente activo (macromolécula activa) que contienen con respecto al peso total de los ingredientes expresado en porcentaje comprende desde el 0 % hasta el 66 % en peso.

10. Composiciones farmacéuticas, según las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizadas** porque se preparan bajo una forma apropiada para su aplicación por vía oral, nasal, vaginal, pulmonar y tópica, presentando las partículas una elevada carga positiva que facilita su interacción con epitelios y mucosas.

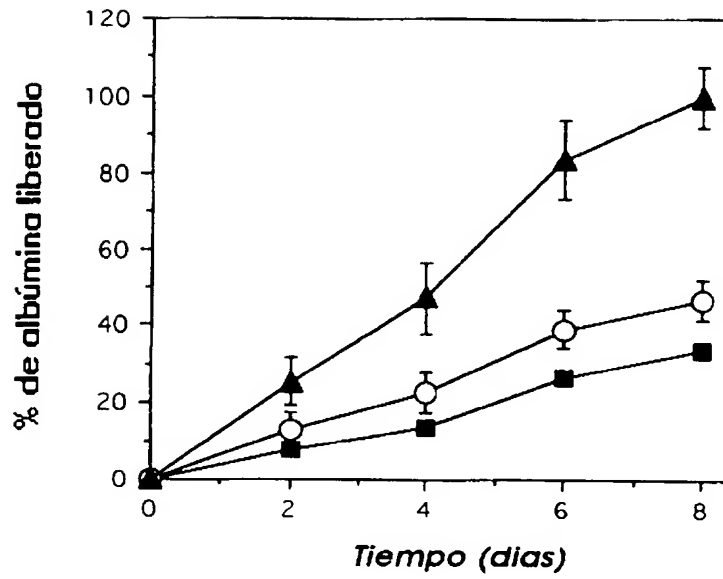


Figura 1

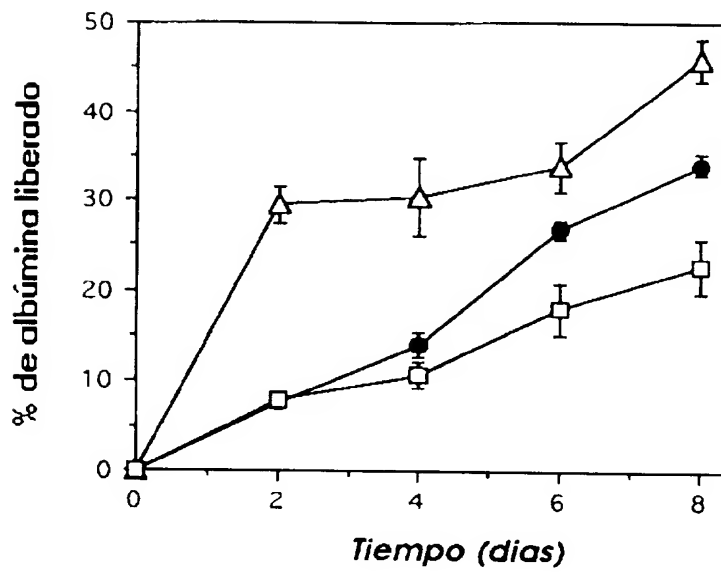


Figura 2



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

⑪ ES 2 114 502

⑫ N.º solicitud: 9601685

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 29.07.96

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑮ Int. Cl.⁶: A61K 9/51

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	US-5346703-A (VIEGA et al.) 13.10.94 * Todo el documento *	1-10
Y	WO-9605810-A (DANBIOSYST UK LIMITED) 29.02.96 * Página 4, línea 20 - página 5, línea 15; página 11, líneas 9-26; reivindicaciones *	1-10
Y	WO-9620698-A (THE BOARD OF REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN) 11.07.96 * Página 7, líneas 1-3; página 11, línea 2; página 13, líneas 10-14; reivindicaciones 1-3,10-12,18-24 *	1-10

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe 01.04.98	Examinador H. Aylagas Cancio	Página 1/1
----------------------------------------------	---------------------------------	---------------